

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE AGRONOMIA

RAMON FELIPE SCHERER

**RESGATE E PROPAGAÇÃO DE MATERIAL CRIULO DE ABACAXI EM SANTA  
CATARINA**

Relatório de estágio de conclusão apresentado como  
Parte dos requisitos para a obtenção de graduação em  
Engenharia Agrônoma na Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Miguel Pedro Guerra

Supervisor: Lírio Luiz Dal Vesco

Florianópolis

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE AGRONOMIA

RESGATE E PROPAGAÇÃO DE MATERIAL CRIOULO DE ABACAXI EM SANTA  
CATARINA

Banca examinadora:

**Miguel Pedro Guerra**

Professor do Departamento de Fitotecnia/CCA/UFSC

**Lírio Luiz Dal Vesco**

Doutorando de Recursos Genéticos Vegetais

**Aparecido Lima da Silva**

Professor do Departamento de Fitotecnia/CCA/UFSC

**José Afonso Voltolini**

Professor do Departamento de Fitotecnia/CCA/UFSC

Florianópolis, novembro de 2008

## AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo quem me deu as possibilidades de poder cursar a faculdade de agronomia, meu pai e minha mãe, respectivamente Flávio Antônio Scherer e Berta Rieg Scherer. Agradeço também a todos os professores e colegas de classe que me transmitiram conhecimentos ao longo do curso. Agradeço aos professores com quem trabalhei ao longo do curso e que além de conhecimento tive que exercer responsabilidades que me ajudaram e ajudam a formar minha opinião, professoras Maria Leonor Del Rei dos Santos e Ana Zanin, e aos professores Marciel João Stadinik e Robson Di Piero. Agradeço também a orientação dada para a realização deste estágio ao professor Miguel Pedro Guerra, assim como agradeço também ao Doutorando Lírío Luiz Dal Vesco pela supervisão e co-orientação neste estágio. Finalizo agradecendo a Deus pela oportunidade de viver e de cursar esta faculdade a qual estive apaixonado desde os primeiros dias de aula.

## RESUMO

Apostando na tendência de organizações públicas em fomentar a reativação da produção de abacaxi no litoral catarinense, realizou-se estágio com resgate e propagação de variedades crioulas de abacaxi para revitalizar sua cultura no litoral do Estado de SC, e como alternativa para a substituição da cultura do fumo. Foram coletadas 10 variedades crioulas das quais foram excisadas gemas, as quais foram introduzidas *in vitro*. Os genótipos utilizados para a realização dessas atividades foram originados de um programa de resgate destes materiais, iniciado na década de 1980, e operacionalizado em conjunto entre a Epagri e o CCA/UFSC. Os materiais genéticos foram posteriormente cultivados no Campo Experimental de Jaguaruna, vinculada à Estação Experimental da Epagri de Urussanga. Foram empregadas várias metodologias para a multiplicação e aclimatização das mudas geradas no processo de micropropagação, visando a multiplicação massal de mudas isentas de pragas e doenças. A partir disto pretende-se estabelecer um banco de plantas matrizes para distribuição junto aos agricultores do litoral visando à revitalização desta atividade.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 6  |
| 2. JUSTIFICATIVA .....   | 7  |
| 3. Revisão Bibliográfica .....   | 8  |
| 3.1. Aspectos gerais da cultura .....  | 8  |
| 3.2. Propagação e micropropagação .....  | 10 |
| 4. OBJETIVO GERAL.....   | 16 |
| 4.1. Objetivos Específicos.....  | 16 |
| 5. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS .....  | 17 |
| 5.1. MATERIAL E MÉTODOS.....   | 18 |
| 5.1.1. Indução de gemas axilares.....  | 18 |
| 5.1.2. Multiplicação de brotos em sistema de imersão temporária e estacionária.. | 18 |
| 5.1.3. Aclimação das mudas .....   | 19 |
| 5.2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 20 |
| 5.2.1. Indução de gemas axilares.....  | 20 |
| 5.2.2. Multiplicação de brotos em sistema de imersão temporária e estacionária.. | 22 |
| 5.2.3. Aclimatização das mudas .....   | 24 |
| 5.3. CONCLUSÕES .....  | 25 |
| 5.4 - OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS .....                                      | 26 |
| 5.4.1. Coleta de variedades crioulas .....                                       | 26 |
| 5.4.2. Formação de banco <i>in vitro</i> , e <i>in vivo</i> .....                | 27 |
| 5.4.3. Outras atividades referentes a estudos com aclimação de mudas.....        | 28 |
| 5.4.4 Atividades rotineiras de laboratório .....                                 | 28 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....                             | 31 |
| 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 32 |

## 1. INTRODUÇÃO

Mesmo estando, ainda hoje, entre os maiores produtores de abacaxi do mundo (Teixeira 2001), o Brasil registrou a partir da década de 70 uma progressiva redução na área plantada e na produção do fruto. Isto se deu principalmente devido ao ataque do fungo *Fusarium moniliforme* Schield var. *subglutinans* wr, que comprometeu a viabilidade econômica da produção (Guerra et al. 1999). A gomose (ou fusariose), como é chamada a doença provocada pelo *F. moniliforme* Schield var. *subglutinans* wr., pode comprometer 100% da produção (Santos & Zambolim 2002).

O mais eficiente meio de disseminação deste fungo é através de mudas doentes, tanto que mudas sadias plantadas em solos infestados pelo fungo não são contaminadas. Uma ferramenta eficiente para a produção de mudas isentas de pragas e doenças é a biotecnologia, através da micropropagação. (Teixeira et al. 2001).

O presente trabalho visa resgatar e propagar variedades crioulas de abacaxizeiro catarinense para possibilitar a formação de lavouras matrizes regionais, o que viabilizará o cultivo com variedades adaptadas a diversas regiões catarinenses e em quantidades suficientes para suprir os produtores.

Como estratégias de resgate de variedades crioulas serão empregadas ferramentas biotecnológicas relacionadas com a micropropagação dessas variedades, já adaptadas às condições eco-climáticas de Santa Catarina. Estas metodologias serão realizadas junto ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) do CCA/UFSC. Este laboratório tem experiência consolidada nesta área uma vez que os trabalhos de resgate e multiplicação *in vitro* de materiais crioulos de abacaxi já são realizados há mais de 20 anos.

## 2. JUSTIFICATIVA

A biotecnologia através da micropropagação por organogênese direta a partir de gemas axilares, que podem ser extraídas de mudas ou de plantas adultas, é uma eficiente forma de produzir mudas sadias (TEIXEIRA 2001), podendo, segundo Guerra et al. (1999) produzir 100000 brotos a partir de uma gema em 12 meses. Porém essas mudas são, segundo Teixeira et al. (2001), cerca de 4 a 10 vezes mais caras do que as mudas convencionais, inviabilizando a aquisição dessas mudas diretamente pelos produtores rurais. Entretanto, justifica-se a produção massal de mudas micropropagadas em primeiro instante para a formação de lavouras matrizes de mudas, que necessariamente precisam ser isentas de pragas e doenças. Com o desenvolvimento da tecnologia de produção, pode-se alcançar a excelência de produção de mudas oriundas de laboratório de uma forma que as torne mais baratas do que as produzidas sob maneira convencional.

A revitalização da cultura do abacaxizeiro tem como foco inicial a área litorânea do Estado de Santa Catarina, principalmente para substituir a cultura do fumo, já que o Brasil está comprometido com a convenção-quadro para controle do tabaco, que é um tratado mundial para a redução de fumantes. Este tratado tende a diminuir a demanda do fumo, trazendo como possível consequência futura, impactos negativos para fumicultores. Por isso, a abacaxicultura é uma das alternativas que se mostra viável para a substituição da fumicultura. Já que, segundo dados do ICEPA citando a AFUBRA na safra 2005/2006 a produtividade média de fumicultores foi de 1759Kg/ha, e o preço médio pago para produtores de Santa Catarina, segundo a Associação de Fumicultores Brasileiros, foi de R\$4,24/Kg, totalizando em média um valor líquido pago ao produtor de R\$7458,16/ha. Enquanto que, segundo artigo da Embrapa Transferência de Tecnologia, o lucro líquido anual por hectare da abacaxicultura, no Rio grande do Sul, situa-se em torno de R\$10.000,00.

### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1. Aspectos gerais da cultura

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr) é uma planta xerófita, suculenta, terrestre, herbácea, e com centro de origem no sul do Brasil e norte da Argentina e Paraguai. A classificação botânica, segundo Cronquist, é a seguinte: Reino Plantae, Divisão Magnolophyta, Classe Liliopsida, Sub-Classe Zingiberidae, Ordem Bromeliales, Família Bromeliaceae, e Gênero *Ananas* (Daquinta & Benega, 1997).

O abacaxizeiro evoluiu de um ancestral epífita, assim como ainda são hoje muitas espécies pertencentes a família Bromeliaceae (Cabral 2004). Maeda (2005), afirma que o abacaxizeiro é uma planta tropical, originária de terras recém desmatadas, e que requer poucos tratos culturais para seu crescimento e produção.

Segundo Maeda (2005) citando dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE) de 2005, o Brasil produziu em 2004 1,43 bilhões de frutos, em 55 mil hectares plantados, totalizando, em média, 26268 frutos/ha. Porém dados mais recentes obtidos do IBGE apontam que o Brasil, entre os anos de 2002 e 2006, foi o maior produtor mundial, totalizando 13,4% da produção mundial. Ainda utilizando dados do IBGE de 2007 é possível afirmar que na época o abacaxi respondia por 5,2% da comercialização de frutas. No ranking da comercialização mundial de frutas o abacaxi está em nono lugar. Porém, mesmo estando sempre entre os maiores produtores, as exportações brasileiras desta fruta são tímidas. (MARIN ET AL., 2008 citando EMBRAPA, 2007). Os principais países produtores do fruto no mundo são Tailândia, Brasil e Filipinas, totalizando 40 % de toda produção. Porém, os maiores exportadores não são os maiores produtores, sendo que estão entre os maiores exportadores Costa Rica, Cote d'Ivoire, França, Bel-Lux, Filipinas, Holanda e Honduras. Por outro lado, dados do Sebrae apontam que os maiores importadores são Estados Unidos, França, Bélgica e Luxemburgo.

Maeda (2005) cita Teixeira et al. (2001) para afirmar que a cultura do abacaxi é relativamente exigente em nutrientes, extraindo em um hectare a uma densidade de 50000 plantas, aproximadamente, 350 Kg de nitrogênio, 30 Kg de Fósforo e 500 Kg de potássio. O abacaxizeiro tem a capacidade de associar-se a fungos micorrízicos e bactérias diazotróficas, capazes de aumentar a área de absorção radicular e fixar nitrogênio do ar, respectivamente (Daquinta & Benega, 1997). Isto explicaria a boa



adaptação desta espécie em regiões de solos pobres, mesmo sendo uma cultura com alta exigência em nutrientes.

O abacaxizeiro é um representante de plantas que apresentam o metabolismo CAM facultativo, metabolismo esse que se caracteriza pela atuação da via C3, porém sob estímulos de falta de água, salinidade, fotoperíodo ou termoperíodo atuam com comportamento CAM (Pimentel, 1998). Este se caracteriza pela separação temporal da captação do  $\text{CO}_2$  e da fotossíntese. Ou seja, em condições de potencial hídrico de água insuficiente para ocorrer a absorção de água e sais minerais, ocorre o fechamento dos estômatos durante o dia, impedindo a evapotranspiração, e a captação do  $\text{CO}_2$  e do ar atmosférico. Dessa forma, o  $\text{CO}_2$  e o ar atmosférico são absorvidos durante a noite, sendo que o  $\text{CO}_2$  é armazenado na forma de ácido málico nos vacúolos (Taiz & Zeiger, 1998). A fotossíntese ocorre durante o dia, na qual o ácido málico é descarboxilado, liberando  $\text{CO}_2$  para então ser transformado em carboidrato através do ciclo de Belson-Calvin. Porém, se houver água suficiente no solo capaz de ser absorvida pela planta, o abacaxizeiro funcionará através do metabolismo C3, ou seja, realizando tanto a captação do  $\text{CO}_2$ , quanto a fotossíntese durante o dia. Segundo Pimentel (1998) citando Osmond & Holtum (1981) o metabolismo CAM não permite grande acúmulo de matéria seca, mas economiza água, e é considerado o único metabolismo fotossintético adaptado à seca, ou seja, possui alta eficiência do uso da água fixando de 10 a 40g de  $\text{CO}_2$  por kg consumido de água, enquanto que as vias C3 e C4 consomem em média, respectivamente, 1 a 3 e 2 a 5 gramas de  $\text{CO}_2$  por Kg absorvido de água. Este mesmo autor ainda afirma que plantas com metabolismo CAM facultativo podem atingir grande produtividade quando funcionam através do metabolismo C3, sendo que o abacaxi pode atingir o crescimento de 28 gramas de matéria seca por hectare em um dia. Porém quando funcionam através do metabolismo CAM, devido a algum estresse ambiental, acumulam pouca matéria seca, tendo sua absorção máxima de  $\text{CO}_2$  em  $7,6\mu\text{mol de CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , enquanto que a absorção de  $\text{CO}_2$  em plantas C3 pode chegar até a aproximadamente  $16\mu\text{mol de CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Esta característica é comprovada através de um experimento feito por Melo et al. (2006) no qual evidenciam que a irrigação balanceada para o cultivo do abacaxizeiro contribui para um maior desenvolvimento vegetativo, assim como também na produção da fruta.

A abacaxicultura brasileira está concentrada no cultivo das cultivares Pérola e Smooth Cayenne (Guerra et al. 1999). Ainda segundo estes autores, desta vez citando Koller (1981) e Giacomelli & Teófilo Sobrinho (1984), houve uma queda progressiva na

área produzida devido ao ataque do fungo *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, associado ao ataque da broca do fruto (*Tecla basalides* Geyer). O ataque da fusariose pode causar perdas diretamente no fruto, e em plantas no estágio de desenvolvimento. A forma preponderante da disseminação do fungo se dá através de mudas contaminadas, ou seja, mudas propagadas vegetativamente oriundas de plantas mães infectadas (Guerra et al. 1999). Esses autores citam Couto et al. (1984) para afirmar que a principal forma de controle recomendada para a gomose é a utilização de mudas sadias, e citam Cabral & Matos (1986) para afirmar que além da utilização de mudas sadias, a utilização de variedades resistentes é outra alternativa.

Segundo Cabral et al. (1985), Kimati & Tokeshi (1964) data de 1962 a primeira referência da gomose no Brasil. Segundo Souto et al. (1984), as duas principais variedades plantadas no Brasil (Pérola e Smooth cayenne) são altamente suscetíveis à doença, porém, outras variedades como a Perolera são resistentes. Couto et al. (1984) ao pesquisar maneiras de controle e de minimização de ataque da gomose em lavouras de abacaxi concluíram que o tratamento de mudas com Benomyl, até então indicado, não surtia o efeito esperado. Outra conclusão deste mesmo experimento foi que a cura por 10 dias precedidos por armazenamento sob lona preta por 14 dias, a fim de elevar a temperatura, proporcionou um ambiente favorável ao aparecimento de sinais da doença, o que permitiu uma exclusão de materiais contaminados. Desta forma, foi possível selecionar, em sua grande maioria, materiais sadios, o que resultou em bons resultados produtivos e redução significativa da doença na lavoura.

O abacaxizeiro é uma planta de reprodução predominantemente vegetativa, por meio de mudas, já que ocorre auto-esterilidade entre plantas do mesmo grupo, ocorrendo a formação do fruto através de partenocarpia. Ocorrerá formação de sementes apenas nos cruzamentos entre grupos diferentes, tendo aplicação exclusivamente para pesquisas (Reinhardt 1998).

### **3.2. Propagação e micropropagação**

Os tipos de mudas oriundas de propagação vegetativa são classificados como sendo: Coroa, Filhote, Filhote-rebentão e Rebentão. A coroa é a brotação do ápice do fruto, tem o ciclo mais longo entre as mudas de propagação vegetativa possíveis. As mudas tipo Filhote podem ser originadas do ápice do pedúnculo (Filhote) e da base do pedúnculo (Filhote-rebentão) e tem o ciclo intermediário entre coroa e rebentão. As

mudas tipo rebentão são originadas das brotações do caule, e tem o ciclo mais curto entre as mudas propagadas vegetativamente. O tempo do ciclo tem relação direta com as reservas nutritivas de cada tipo de muda, conseqüentemente a muda rebentão é a que possui maior reserva energética, seguida das mudas tipo filhote, e por último, com menos reserva energética está a muda tipo coroa (Reinhardt 1998). A multiplicação natural (vegetativa) do abacaxi é muito lenta, e forçou o homem a aprender a utilizar todos os meios para produzir quantidade suficiente para a formação de lavouras (Daquinta & Benega 1997). Já que segundo as recomendações da EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA sediada em Cruz das Almas – Bahia, a quantidade de mudas para plantar um hectare normalmente varia entre 37.000 e 55.550 plantas. Segundo Pasqual et al.(1998) com o auxílio da biotecnologia é possível produzir milhares de mudas de abacaxi isentas de pragas e doenças em um pequeno espaço de tempo, a partir de uma só gema. E como ferramenta biotecnológica, a micropropagação, ou propagação *in vitro*, possibilita estas características.

O desenvolvimento de um protocolo de micropropagação de abacaxizeiro recomenda-se que após a excisão das gemas laterais proceda-se um processo de desinfestação que consiste na imersão das gemas por 1 minuto em álcool 70%, seguida da imersão por 15 minutos em solução de 2% de hipoclorito de sódio, e que por último proceda-se uma tríplice lavagem em água destilada, desmineralizada e autoclavada (GUERRA et al., 1999). Estes autores concluíram que o meio de cultura que apresentou os melhores resultados para a propagação de mudas foi o meio de cultura MS suplementado com 2,7  $\mu$ M de ANA (ácido naftalenoacético) e 4,4  $\mu$ M de BAP (benzilaminopurina). E que as repicagens dos frascos devem ser em intervalos de 35 dias. E, a aclimação deve ser com mudas com altura igual ou superior a 3 centímetros, resultando desta forma em 95,5% de sobrevivência, quando transferidas para túneis de nebulização com irrigação intermitente.

No período de adaptação ou aclimatização das mudas, a inoculação de *Azotobacter* (*Chroococcum* sp.) e fungos micorrízicos arbuscular-vesicular (*Glomus manihotes*, *G. Occultum* e *G. moseae*) estimulam o crescimento e o desenvolvimento da muda e reduzem o tempo de adaptação (Daquinta & Benega 1997). O tempo de adaptação normalmente é de 6 a 8 meses (Teixeira et al., 2001). Segundo esses mesmos autores as vantagens da produção de mudas de abacaxi em laboratório são a produção de mudas com alto vigor e uniformidade, a ausência de pragas e doenças, mudas enraizadas e prontas para serem plantadas em campo (de preferência com

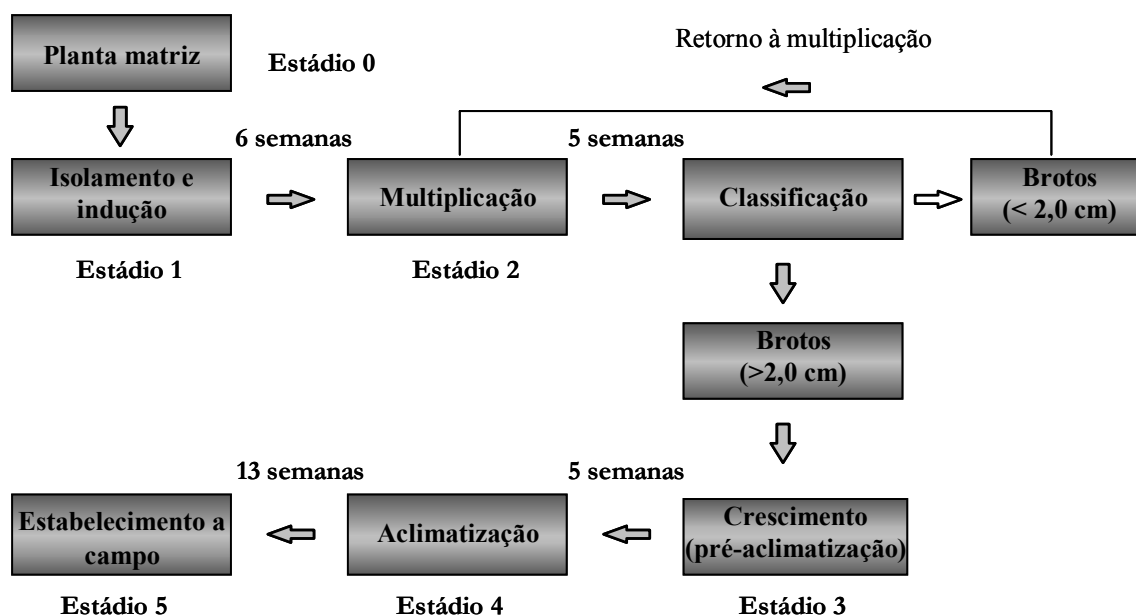
30cm de altura), e disponibilidade de acordo com a demanda em termos de época de plantio. Estes mesmos autores apontam como desvantagens o custo de até 10 vezes maior para a produção em laboratório; a infra-estrutura tecnológica necessária; o alto investimento inicial para a construção de laboratório e casa de vegetação; a exigência de mão-de-obra especializada e consequentemente melhor remunerada; e os constantes avanços na tecnologia empregada que eventualmente podem exigir mudanças de protocolos e até de arquitetura das instalações.

Dal Vesco et al. (2000) apontam ainda como desvantagem a variação somaclonal que pode ocorrer com o cultivo *in vitro*, afetando características morfológicas, pigmentação, razão de crescimento e habituação a auxinas e citocininas. Esses autores citam Wakasa (1989) para apontar ainda que ensaios feitos por este autor resultaram em taxa de variação de 100% para explantes oriundos de sincarpo, 34% em brotos oriundos de gemas axilares, e 7% em brotos originados de gemas da coroa. Já em experimento realizado por Dal Vesco et al. (2000) foi observado que a variação somaclonal de mudas oriundas de micropropagação *in vitro* através da organogênese direta de gemas axilares, resultou em variações que estiveram dentro dos limites aceitáveis de fidelidade clonal reportados para a cultura de tecidos de outras espécies. Neste mesmo experimento foi observada também a porcentagem de mudas infectadas por fusariose, sendo 0,7% das plantas e 0,2% dos frutos. Ou seja, este experimento comprovou a eficiência do protocolo elaborado por Guerra et al. (1999) em produzir mudas isentas de fusariose (DAL VESCO et al. 2000).

O protocolo otimizado para a produção de mudas *in vitro* de diferentes genótipos de abacaxizeiro tem como base a esquematização mostrada na Figura 1. Estes procedimentos são claramente seguidos passo a passo no LFDGV do Dpto. De Fitotecnia do CCA/ UFSC, para o cultivo de Bromeliáceas. Utilizando este protocolo, para a cultivar Pérola, o uso de explantes com tamanho entre 1,1 e 2,0 cm, em meio de cultura MS adicionado de ANA (2 $\mu$ M) e BAP (4 $\mu$ M), apresentaram os melhores resultados (13,5 brotos/explante) não diferindo significativamente do tratamento utilizando explantes com tamanho entre 2,1 e 3,0 cm (11,5 brotos/explante) (DAL VESCO et al, 2001).

O protocolo de micropropagação convencional utiliza meios de cultura líquido em sistema de imersão estacionária para a multiplicação de brotos, tal como, desenvolvido por GUERRA et al. (1999), DAL VESCO et al, (2000) e DAL VESCO et al, (2001). Nestes casos utilizando-se frascos de 300ml com aproximadamente 25 ml de meio de

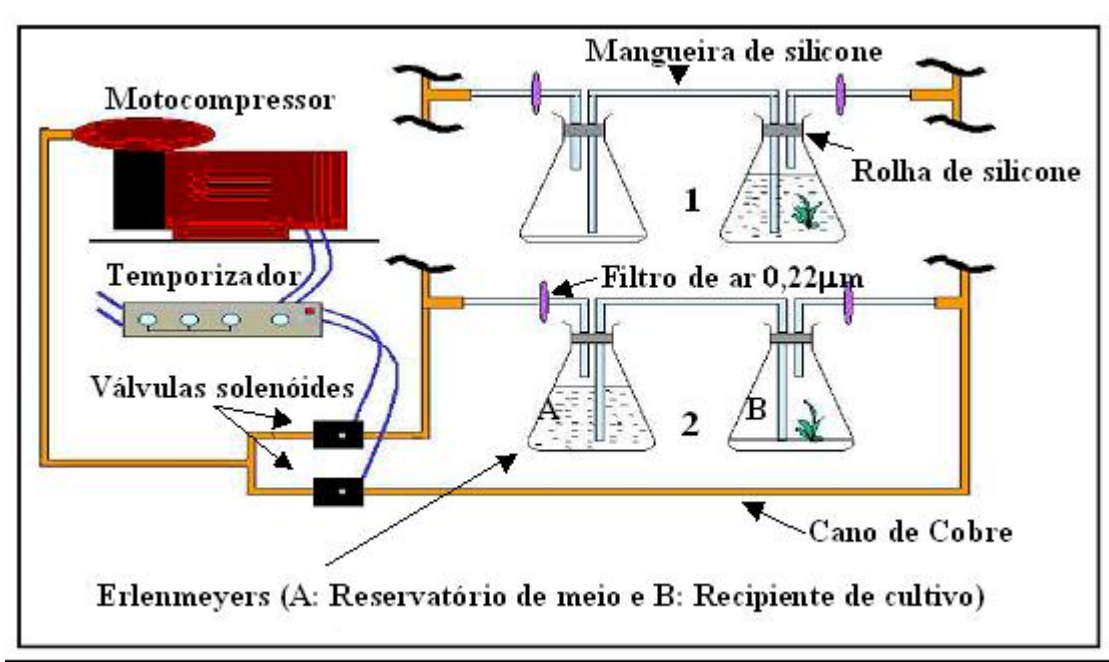
cultura. Este sistema requer a repicagens sucessivas, em intervalos ótimos de 35 dias, quando o objetivo é a multiplicação massal de brotos. Enquanto que, o uso do sistema de imersão temporária, além de proporcionar uma maior taxa multiplicação de brotos, promove a renovação da atmosfera do meio de cultura, proporcionando as vantagens do meio líquido, mas sem problemas como asfixia e vitrificação que podem ocorrer no sistema de imersão estacionária (Feuser, 2000, citando Teisson e Alvard, 1994).



**Figura 1.** Fluxograma proposto para a micropropagação de mudas de abacaxizeiro em grande escala. Fonte: Dal Vesco et. al. (2001).

Em um sistema de micropropagação de mudas em grande escala é necessário reduzir ao máximo o uso de mão-de-obra e, principalmente, a redução dos custos. Teoricamente a imersão temporária proporciona essas características (RECH FILHO, 2004) e ainda exige menor mão-de-obra, por não necessitar de repicagens sucessivas. No sistema de imersão temporária implantado no LFDGV, cada unidade do sistema é constituída de um conjunto de dois erlenmeyer de 2000 ml (Figura 2 -conjunto 1 e 2). Estes são interligados por uma mangueira de silicone autoclavável, presa em um tubo de vidro, acoplado em uma rolha de silicone autoclavável (Figura 2 – conjunto 1), na qual passa o meio de cultura. O funcionamento do sistema é controlado por um temporizador, que controla o tempo de imersão dos explantes e o intervalo de tempo entre as imersões. Este temporizador aciona o compressor de ar (motocompressor) para inverter os fluxos. Quando acionado, faz com que o meio de cultura seja

empurrado por pressão e passe para o outro recipiente onde contém os explantes. O processo de passagem do meio de cultura ida e volta, ocorre através das mangueiras, fixadas rente ao fundo dos dois erlenmeyers. Ao cessar o tempo de imersão a válvula solenóide inverte o fluxo e o meio volta novamente para o recipiente de depósito. O ar injetado no sistema passa por uma membrana de filtro esterilização de 0,22  $\mu\text{m}$ . O temporizador ligado ao SIT é programado para acionar o compressor de ar a cada 3 horas. E, permanecendo 3 minutos para cada válvula solenóide para permitir a rega e o retorno do meio de cultura para o primeiro frasco. (FEUSER 2000).



**Figura 2.** Representação esquemática do sistema de imersão temporária. Adaptado de Feuser (2000).

As principais recomendações da produção de mudas em laboratório são: a introdução da cultura em novas regiões de plantio, onde ainda não existam problemas fitossanitários para a cultura; a introdução e/ou substituição de novas cultivares, quando não se dispõe de mudas convencionais para iniciar grandes plantios; a multiplicação rápida de genótipos selecionados em programas de melhoramento genético, antes do lançamento de novas cultivares; a produção de material básico para atender programas de produção de mudas certificadas de abacaxi; e no intercâmbio de germoplasma para se evitar introdução de pragas e doenças (Teixeira et al. 2001).

Outra possibilidade da organogênese e micropropagação de abacaxi "*in vitro*" é a conservação de germoplasma. SOARES (2003) cita OLIVEIRA et al.(1998) para afirmar que este tipo de conservação requer pequeno espaço físico, baixo custo de manutenção, ausência de pragas e doenças, diminui os riscos de perdas e controle do

ambiente, o que não é possível no campo. Possibilita ainda, a eventual rápida multiplicação e permite o intercâmbio imediato de germoplasma. Porém, a mesma autora cita que um problema para este tipo de conservação é a necessidade de subcultivos periódicos, necessitando desta forma de mão-de-obra especializada e onerando o processo de conservação. Uma forma de diminuir esse custo é diminuindo a necessidade de subcultivos. Isto é possível através da utilização de um meio de cultura produzido utilizando metade das concentrações necessárias para a produção do meio de cultura MS (SOARES, 2003). Segundo CANTO et al. (2004), a utilização do meio de cultura MS suplementado com 30g de açúcar, 8 g/L de agar e 0,5 mg/L de PBZ (Paclobutrazol) é, também, eficiente para conservação de germoplasma com necessidade de subcultivo reduzidas.

O uso de PBZ também tem sido utilizado, para o mesmo fim, em estudos com abacaxizeiro (FEUSER, 2001) e com outras bromélias (RECH FILHO, 2004). O fitorregulador ANA é uma auxina, segundo Pimentel (1998) as auxinas induzem, principalmente, o crescimento ácido para a elongação celular. O fitorregulador BAP é uma citocinina, e segundo Pimentel (1998) as citocininas, basicamente, estimulam a multiplicação de tecidos meristemáticos. O fitorregulador PBZ é um inibidor da síntese de giberilina (FEUSER, 2000), esta, segundo Pimentel (1998), estimula a expansão celular, logo, o PBZ inibe a expansão celular.

SRIPAORAYA et al. (2003) apontam algumas outras formas da produção de mudas através da biotecnologia. O estabelecimento de gemas em meio Murashigue-Tucker (MT) com suplementação de 2mg/L de ácido indolbutírico ( $9,8\mu\text{M}$ ), 2mg/L de ANA ( $10,74\mu\text{M}$ ) e 2mg/L de kinetina ( $9,29\mu\text{M}$ ). Após o estabelecimento da formação do broto este deve ser transferido para um frasco contendo meio MS suplementado com 2mg/L de benziladenina (BA) ( $8,87\mu\text{M}$ ), para promover a multiplicação de brotos. Outra ferramenta biotecnológica, citada pelo mesmo autor, é a formação de brotos através das folhas basais retiradas de brotos em micropropagação. Essas folhas devem ser alocadas em frascos contendo meio MS suplementado com 0,5mg/L de 2,4D ( $2,26\mu\text{M}$ ) e 2mg/L de BA ( $8,87\mu\text{M}$ ). A formação de calos também é possível utilizando como explante parte de folhas de plantas adultas. Esse tecido deve ser posto em frasco contendo meio MS com 3mg/L de picloran ( $12,42\mu\text{M}$ ). Para formar brotos a partir dos calos formados deve-se transferi-los para frasco contendo meio MS com 1mg/L de BA ( $4,14\mu\text{M}$ ) ou 1,0mg/L de 2,4D ( $4,52\mu\text{M}$ ). Ainda a partir de células do calos é possível produzir brotos em frascos contendo meio MS semi-sólido com 1mg/L de BA ( $4,52\mu\text{M}$ ).

#### **4. OBJETIVO GERAL**

Resgatar variedades crioulas de abacaxizeiro no Estado de Santa Catarina e, por meio da coleta, micropropagação, conservação e geração de viveiros matrizes possibilitar a revitalização do seu cultivo no litoral do estado.

##### **4.1. Objetivos Específicos**

- a) Coletar material crioulo de abacaxi em diferentes regiões de Santa Catarina;
- b) Multiplicar os materiais coletados “in vitro”;
- c) Estabelecer uma coleção de germoplasma “in vitro” e “in vivo”;
- d) Estabelecer experimentos de aclimação e adaptação para o maior número de materiais;
- e) Multiplicar e colocar a disposição mudas matrizes para a produção massal de mudas comerciais.



## 5. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades realizadas no estágio constituem o ciclo completo da produção de mudas de abacaxizeiro em laboratório através da micropropagação por organogênese, a partir de gemas axilares de mudas. No período do estágio e período que antecedeu, como voluntário do LFDGV do Depato. De Fitotecnia/CCA/UFSC, foram executadas atividades desde a coleta de mudas a campo, até a aclimatização de mudas micropropagadas.

Para tornar possível a realização do estágio com o resgate dos processos da produção de mudas micropropagadas do abacaxizeiro, foram necessários realizar a repicagens constante dos brotos já estabelecidos *in vitro* pelos bolsistas do LFDGV. A etapa foi realizada no período que antecedeu ao estágio, permitindo com isto um treinamento com as atividades de um laboratório de micropropagação e possibilitou a multiplicação dos brotos que foram utilizados nos experimentos durante o período do estágio.

A realização dessas atividades foi possível porque iniciei, voluntariamente, os trabalhos de repicagens para a multiplicação dos brotos em dezembro de 2007. O protocolo utilizado neste processo já está bem estabelecido neste laboratório e teve como base os trabalhos desenvolvidos por Guerra et al. (1999) e Dal Vesco et al., (2001). Para a multiplicação dos brotos foi utilizado os acessos Paulo Lopes-SC, coletado pelo Sr. Glaico Sell, os acessos de Itapiranga-SC: Preto Maior, Preto e Amarelo, coletados pelo Prof. Afonso I. Orth e um acesso de Lages coletado por Alan D. Claumann. A partir da obtenção de um grande número de brotos possibilitou a realização dos itens B, C, F e G, da lista a seguir, que indica as atividades que foram realizadas no período de estágio.

### - Experimentos

A - Indução de gemas axilares;

B - Multiplicação de brotos em sistema de imersão temporária e estacionária;

C - Aclimação das mudas.

### - Outras atividades desenvolvidas

D - Coleta de variedades crioulas;

E - Formação de banco *in vitro* e *in vivo*;

F - Outras atividades referentes a estudos com aclimação de mudas;

## **5.1. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1.1. Indução de gemas axilares**

Extraíram-se 10 gemas de cada variedade coletada na estação experimental de Jaguaruna, 9 gemas da variedade Smooth Cayenne e 13 gemas da variedade Mato Grosso.

A extração e a inoculação de gemas basais seguiram o protocolo estabelecido por Guerra et al. (1999). Em ambiente de laboratório as gemas foram lavadas em água corrente e com 2-3 gotas de sabão neutro. Em câmaras de fluxo laminar as gemas foram desinfestadas com: 1) Álcool (70%) por um minuto; 2) água sanitária comercial a 40% por 15-20 min; 3) três enxagues em água destilada e autoclavada. Em seguida foram retiradas as primeiras folhas que cobrem as gemas e inoculadas em tubos de ensaio (25x150 mm), sobre pontes de papel filtro e 15 ml dos meios de cultura líquidos MS, suplementado com 2  $\mu$ M de ANA (Ácido naftalenoacético) e 4  $\mu$ M de BAP (6-benzilaminopurina) (Figura 3 – letra a).

### **5.1.2. Multiplicação de brotos em sistema de imersão temporária e estacionária**

O experimento foi conduzido na sala de crescimento do Laboratório de Fisiologia e Genética Vegetal, com fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 40-50  $\mu$ mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. O SIT está representado por 4 pares de Erlenmeyer de capacidade volumétrica de 2 litros (Figura 3 – letra b), e o SIE está representado por 40 frascos com capacidade volumétrica de 300ml (Figura 3 – letra c).

Grupos de brotos da variedade de abacaxizeiro preto maior Itapiranga no estágio de proliferação em frascos no SIE foram à fonte de explantes para o experimento. Como meio de cultura básico foi utilizado a formulação salina MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionados de sacarose (30g/l), vitaminas de MS e o pH ajustado para 5,5, antes da autoclavagem.

O delineamento do experimento foi um bifatorial (2x4), onde foram testados oito tratamentos: Fator A - dois sistemas de cultivo, SIT (aparato com Erlenmeyer - modelo LFDGV) e SIE (em frascos tipo conserva), combinados com 4 meios de cultura: 1) MS isento de fitorreguladores; 2) a suplementação de PBZ (6  $\mu$ M); 3) a suplementação de

ANA (2  $\mu$ M) e BAP (4  $\mu$ M), meio padrão utilizado no LFDGV para bromeliaceas e; 4) a suplementação de ANA (2  $\mu$ M); BAP (4  $\mu$ M) e PBZ (6  $\mu$ M), meio de cultura que apresentou melhor taxa de proliferação, de acordo com Feuser et al., (2000) no SIT.

Cada unidade experimental foi constituída de: para o SIT - um aparato de imersão temporária e para o SIE foi utilizado 3 frascos e inoculou-se um broto para cada 6 ml de meio de cultura em forma de Bloco Completos Casualizados e repetidos três vezes. Para o SIT, o intervalo de imersão foi de três horas e com a permanência de 3-4 minutos em contato com o meio de cultura.

Dados de número de brotos por classe de altura (cm) foram coletados em 60 dias em cultivo. Os dados coletados foram compilados em planilhas Excel e submetidos à análise da variância. Quando necessário os dados originais foram transformados para obter homogeneidade das variâncias e ao teste de separação de médias, SNK a 5%.

### **5.1.3. Aclimação das mudas**

Utilizando como parâmetro a produção comercial de mudas micropropagadas de bananeira pela EPAGRI Itajaí, utilizou-se substrato a base de casca de arroz carbonizada, com partes de matéria orgânica e fertilizante químico.

Utilizaram-se 3 tipos de substratos depositados sobre calhão. Um dos substratos foi a base de casca de arroz carbonizada (CAC), com 12,5% de composto de lixo orgânico (CLO) e 1,2g de NPK, 5-20-10/dm<sup>3</sup> com uma altura de substrato de 10cm (calhão 1), outro utilizou os mesmos componentes, porém com uma coluna de substrato de 15cm (calhão 2), e o último (calhão 3) foi a base de horizonte B de Argissolo Vermelho-Amarelo, com 12,5% de CLO e 1,2g de NPK 5-20-10/dm<sup>3</sup> de substrato, e coluna de 15cm de substrato. Além do tipo de substrato, estudou-se a distância entre mudas, 10cm, 7cm e 5cm. A distância entre plantas na linha foi fixa em 8cm. O objetivo do experimento foi a obtenção da melhor combinação para a aclimação de mudas micropropagadas em calhões.

O delineamento do experimento foi um bifatorial (3x3), onde foram testados 9 tratamentos: Fator A – calhão 1, calhão 2 e calhão 3, combinados com Fator B: 3 distâncias entre linhas 10cm, 7cm e 5cm.

## 5.2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.2.1. Indução de gemas axilares

A alta porcentagem de contaminação foi atribuída ao fato de as mudas serem originadas de condições de campo e com isto trazendo uma carga considerável de microorganismos contaminantes (Tabela 1). Porém, o número de brotos desenvolvidos é mais do que suficiente para a multiplicação massal de brotos, e resgate dos acessos.

Tabela 1. Porcentagem de contaminação, de gemas sem respostas, de indução e números de brotos de abacaxizeiro de diferentes acessos.

| Acesso            | Contaminação (%) | Sem resposta (%) | Indução (%) | Nº. de Brotos Desenvolvidos |
|-------------------|------------------|------------------|-------------|-----------------------------|
| Camboriú          | 50               | 0                | 50          | 5                           |
| CEJ               | 50               | 10               | 40          | 4                           |
| Jaguaruna         | 40               | 0                | 60          | 6                           |
| Delícia           | 20               | 10               | 70          | 7                           |
| Pérola NE         | 10               | 60               | 30          | 3                           |
| Urussanga         | 20               | 10               | 70          | 7                           |
| Armazém           | 50               | 0                | 50          | 5                           |
| Treviso B         | 50               | 10               | 40          | 4                           |
| AB 1 (Brancher 1) | 40               | 10               | 50          | 5                           |
| 7 NVZA            | 50               | 0                | 50          | 5                           |
| Smooth Cayene     | 33,3             | 22,2             | 44,5        | 4                           |
| Mato Grosso       | 30,8             | 30,8             | 38,4        | 5                           |



Figura 3 – Micropropagação do abacaxizeiro por meio da imersão temporária e estacionária. **a** – gema induzida à brotação. **b** – Sistema de imersão temporária (SIT). **c** - Sistema de imersão estacionária (SIE) **d-e** - Desenvolvimento de brotos em SIT com meio MS básico suplementado com ANA (2  $\mu$ M), BAP (4  $\mu$ M). **f** – desenvolvimento de brotos em SIE, meio de cultura MS básico com ANA (2  $\mu$ M), BAP (4  $\mu$ M) e PBZ (6  $\mu$ M). **g** – Frascos com brotos em diferentes estádios de multiplicação em SIE com meio de cultura MS básico suplementados com ANA (2  $\mu$ M), BAP (4  $\mu$ M).

### 5.2.2. Multiplicação de brotos em sistema de imersão temporária e estacionária

O uso do sistema SIT combinado com ao meio de cultura MS e a suplementação com os fitorreguladores ANA, BAP (Figura 3 – letras d - e) promoveram uma maior taxa de proliferação de brotos (16,1 brotos), em 60 dias de cultivo (Tabela 2). Entretanto estes valores não diferem significativamente, segundo teste SNK (5%), do número de brotos produzidos, quando foi suplementado com a combinação dos fitorreguladores ANA, BAP e PBZ (15,4 brotos). Porém, as taxas de proliferações de brotos diferem ( $P < 0,01$ ), segundo teste SNK, quando comparados com a mesma combinação de fitorreguladores, mas utilizando o sistema de imersão estacionária (Tabela 2). Estes resultados confirmam que o uso do SIT promove maior taxa de multiplicação quando comparado ao SIE sob mesmo meio de cultura, confirmando assim os resultados obtidos anteriormente por Feuser et al. (2000). Porém, a multiplicação que apresentou melhor resultado no SIE foi a combinação MS básico com os fitorreguladores ANA, BAP e PBZ (Figura 3 – letra f), apresentando expressiva taxa de multiplicação de brotos (10,1).

**Tabela 2** - Número médio de brotos\* do acesso de abacaxi Preto Maior Itapiranga em relação a combinação e concentração dos fitorreguladores suplementados ao meio de cultura MS, em diferentes sistemas de imersão, 60 dias em cultivo.

| Fitorregulador ( $\mu\text{M}$ )   | Sistema de imersão |             | Média        |
|--|--------------------|-------------|--------------|
|  | Estacionário       | Temporário  |              |
| MS   | 2,8de              | 1,7e        | <b>2,2C</b>  |
| PBZ (6 $\mu\text{M}$ )   | 3,7d               | 3,8d        | <b>3,8B</b>  |
| ANA (2 $\mu\text{M}$ ) + BAP (4 $\mu\text{M}$ )                          | 6,3c               | 16,1a       | <b>11,1A</b> |
| ANA (2 $\mu\text{M}$ ) + BAP (4 $\mu\text{M}$ ) + PBZ (6 $\mu\text{M}$ ) | 10,1b              | 15,4a       | <b>12,7A</b> |
| <b>Média</b>   | <b>5,7b</b>        | <b>9,2a</b> | <b>7,5</b>   |
| <b>CV(%)</b>   |                    | <b>9,6</b>  |              |

\* Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna, minúscula em negrito na linha e minúscula na interação entre fatores, não apresentam diferenças significativa, segundo teste SNK ( $p \leq 0.05$ ),. Dados transformados em  $(x + 0,5)^{0,5}$

Observou-se também neste ensaio que a suplementação ao meio de cultura MS suplementado com 6  $\mu\text{M}$  PBZ somente promoveu aumento significativo na taxa de proliferação, quanto comparado dentro do sistema SIE (Tabela 2). Enquanto que,

Feuser et al. (2000), observaram uma taxa de proliferação de brotos significativamente superior, quando suplementaram ao meio de cultura MS suplementado com 6  $\mu$ M PBZ, no cultivo do acesso Amarelinho (7 NVZA). Resultado obtido também por Rech Filho (2004) que aumentou a taxa de multiplicação de brotos adicionando PBZ no meio MS sendo que no SIT o meio MS suplementado com PBZ 6 $\mu$ M apresentou taxa de multiplicação 5,68 vezes maior que o meio MS isento de fitorreguladores, e no SIE 5,09 vezes maior. No presente trabalho as taxas respectivas foram de 2,22 e 1,21 vezes maior.

Para altura dos brotos os sistemas de imersão não apresentaram diferenças estatísticas(Tabela 3).

**Tabela 3** – Altura média (cm) de brotos\* do acesso de abacaxi Preto Maior Itapiranga em relação a combinação e concentração dos fitorreguladores, suplementados ao meio de cultura MS, em diferentes sistemas de imersão, 60 dias em cultivo.

| Fitorregulador ( $\mu$ M)                           | Sistema de imersão |             | Média       |
|---|--------------------|-------------|-------------|
|   | Estacionário       | Temporário  |             |
| MS  | 2,6a               | 1,2b        | <b>1,9A</b> |
| PBZ (6 $\mu$ M)                                     | 0,6c               | 0,7bc       | <b>0,7B</b> |
| ANA (2 $\mu$ M) + BAP (4 $\mu$ M)                   | 1,0bc              | 0,6bc       | <b>0,8B</b> |
| ANA (2 $\mu$ M) + BAP (4 $\mu$ M) + PBZ (6 $\mu$ M) | 0,3c               | 0,5bc       | <b>0,4B</b> |
| <b>Média</b>  | <b>1,1a</b>        | <b>0,7a</b> | <b>0,9</b>  |
| <b>CV(%)</b>  | <b>10,4</b>        |             |             |

\* Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna, minúscula em negrito na linha e minúscula na interação entre fatores, não apresentam diferenças significativa, segundo teste SNK ( $p \leq 0.05$ ). Dados transformados em Log (x + 1).

Brotos originados no SIE apresentaram média ligeiramente superior (1,1cm) aos valores obtidos para o SIT (0,7cm). Contudo, não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre os sistemas de imersão para este parâmetro. Entre os meios de cultura, o que proporcionou maiores valores para este parâmetro foi o meio MS básico (1,9cm), sendo que o tratamento MS básico no SIE resultou em valores médios (2,6 cm) que diferiram estatisticamente de todos os outros. O tratamento MS básico, em SIT (1,2cm) também foi superior aos demais tratamentos porem não diferiu estatisticamente deles, exceto do tratamento com o meio de cultura básico suplementados com ANA (2  $\mu$ M), BAP (4  $\mu$ M) e PBZ (6  $\mu$ M), no SIE que apresentou os

menores brotos entre todos os tratamentos. Em estudo realizado por Feuser (2000) a presença de PBZ também promoveu a redução na altura média dos brotos quando comparados a brotos crescidos em meios livres de PBZ. Em experimento realizado por Rech Filho (2004), brotos de bromélias da espécie *Aechmea fasciata* apresentaram redução consistente de crescimento sob meio MS com as concentrações de 2 µM, 4 µM e 6µM de PBZ, quando comparados ao MS isento de fitorreguladores.

O conjunto de resultados sugere que a ausência de fitorreguladores promoveu a dominância apical e com isto ocorre uma baixa taxa de multiplicação de gemas. Já a presença do fitorregulador BAP promoveu alta taxa de multiplicação com pouco crescimento em altura. O fitorregulador PBZ mostrou-se eficiente para inibir o crescimento em altura, entretanto não mostrou resultados eficientes para a multiplicação de brotos quando foi único fitorregulador presente, mas quando agiu em conjunto com ANA e BAP apresentou ótimos resultados para a multiplicação de brotos.

### 5.2.3. Aclimatização das mudas

O experimento foi implantado em meados de agosto, desenvolvendo-se por cerca de três meses até a coleta dos dados. No período de desenvolvimento das mudas até o recolhimento dos dados para a divulgação neste trabalho não foi possível observar diferenças estatísticas entre os tratamentos para a altura média das mudas (Tabela 4).

Tabela 4 - Crescimento em altura\* de mudas de abacaxizeiro do acesso Paulo Lopes, oriundas de micropropagação, submetidas à diferentes espaços entre linhas 10cm, 7cm e 5cm, e diferentes substratos.

|              | Sistema de plantio |            |            | Média (cm) |
|--------------|--------------------|------------|------------|------------|
|              | Calhão 1           | Calhão 2   | Calhão 3   |            |
| 10cm / linha | 2,0                | 2,4        | 2,6        | <b>2,3</b> |
| 7cm / linha  | 2,1                | 2,3        | 2,2        | <b>2,2</b> |
| 5cm / linha  | 3,1                | 2,6        | 2,2        | <b>2,6</b> |
| Média        | <b>2,4</b>         | <b>2,4</b> | <b>2,3</b> | <b>2,4</b> |
| CV(%)        | <b>18,3</b>        |            |            |            |

<sup>1</sup> - Substrato a base de CAC, com 12,5% de CLO e 1,2g de NPK, 5-20-10/dm<sup>3</sup> com uma altura de substrato de 10 cm. <sup>2</sup> - Substrato a base de CAC, com 12,5% de CLO e 1,2g de NPK, 5-20-10/dm<sup>3</sup> com uma altura de substrato de 15 cm. <sup>3</sup> - Substrato a base de horizonte B de Argissolo Vermelho-Amarelo, com 12,5% de CLO e 1,2g de NPK 5-20-10/dm<sup>3</sup> de substrato, e coluna de 15cm de substrato.



\*Não houve diferença estatística entre os tratamentos, segundo teste SNK ( $p \leq 0.05$ ).

Porém, isso não sugere que as diferentes distâncias entre linhas e diferentes tipos de substratos, não influam no desenvolvimento das mudas no período de aclimação, que varia de 6 a 8 meses, já que o tempo de desenvolvimento das mudas até os dados coletados não chegou nem a metade do recomendado. Em trabalho similar, realizado por Souza Junior et al. (2001) no qual comparou a utilização de tubete grande (5cm x 24,5cm), tubete pequeno (5cm x 13 cm) e saco plástico (10cm x 8cm) no crescimento de altura de mudas micropropagadas da cultivar pérola, em 3 meses, encontrou taxa de crescimento maior em tubetes pequenos (4,38cm), estatisticamente similar à taxa de crescimento em saco plástico (4,00cm), a taxa de crescimento em tubete grande (3,33cm) foi inferior estatisticamente a encontrada em tubete pequeno, e estatisticamente similar a taxa de crescimento em saco plástico. O autor comenta, porém, que a estrutura radicular das mudas crescidas em saco plástico eram superiores às demais.

### 5.3. CONCLUSÕES

A porcentagem de indução de gemas axilares variou de 30 a 70%. Levando-se em conta que no mínimo de 3 gemas devem ser induzidas por variedade, serão necessários introduzir *in vitro* pelo menos 10 gemas por genótipo.

No experimento de multiplicação de brotos, o sistema de imersão temporária teve taxa média superior em 1,61 vezes em relação ao sistema de imersão estacionária.

No sistema de imersão temporária os meios de cultura que obtiveram melhores resultados foram o uso do meio de cultura MS suplementado com ANA (2 $\mu$ M) e BAP (4 $\mu$ M) e a suplementação de ANA (2  $\mu$ M), BAP (4  $\mu$ M) e PBZ (6  $\mu$ M).

Para o uso do sistema de imersão estacionária o meio de cultura MS suplementados com ANA (2  $\mu$ M), BAP (4  $\mu$ M) e PBZ (6  $\mu$ M) revelou melhores taxas de proliferação de brotos.

Para a altura dos brotos, não houve diferença significativa entre sistemas de imersão; O sistema de imersão temporária apresentou média superior a imersão estacionária em 1,47 vezes.

O meio de cultura MS isento de fitorreguladores promoveu uma maior e significativa altura média dos brotos (2,51 vezes) em relação aos demais tratamentos testados.

No experimento de aclimação de mudas os resultados dos dados obtidos até o terceiro mês de desenvolvimento não diferem estatisticamente entre si. Contudo, aparentemente, com o emprego da maior densidade seria possível economizar espaço e otimizar a mão de obra.

## **5.4 - OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS**

### **5.4.1. Coleta de variedades crioulas**

Em viagem de campo, na Estação Experimental da EPAGRI em Jaguaruna, junto com o professor Miguel Pedro Guerra foi efetuada a coleta de diferentes genótipos de abacaxizeiro. Esses genótipos se originaram de coletas realizadas a partir da década de 1980 por pesquisadores da Epagri e da UFSC. Na época da coleta estava no período de declínio da produção no litoral do estado, e os representantes dos genótipos foram coletados em lavouras comerciais. Posteriormente sob a responsabilidade do pesquisador Ademir Brancher da EPAGRI/Urussanga, estes genótipos foram classificados a partir dos seguintes descritores: tamanho do fruto, peso do fruto, tamanho da coroa, peso da coroa, cor do fruto (sincarpo), cor da casca do fruto, teor °Brix, teor de sólidos totais e relação acidez açúcar.

Através desses dados, levando em consideração o potencial produtivo do genótipo, foram selecionados pelo mesmo pesquisador os genótipos que teriam potencial para ser cultivado comercialmente. Foram esses genótipos selecionados que foram trazidos da estação, para então ser feito banco “*in vivo*” e “*in vitro*” na UFSC. Os genótipos foram os seguintes: Jaguaruna, CEJ, Delícia, 7NVZA, Camboriú, Pérola Nordeste, Armazém, Urussanga, Brancher 1 e Treviso B. Destes materiais foram extraídas gemas basais para a inoculação *in vitro*, e as mudas foram encaminhadas para serem plantadas na Fazenda Experimental da Ressacada da UFSC. Estes genótipos apresentam potencial produtivo e podem compor um banco de matrizes para o LFDGV. Estes genótipos poderão ser utilizados para futura multiplicação atendendo uma demanda de diferentes acessos para o plantio comercial no Litoral de Santa Catarina.

#### 5.4.2. Formação de banco *in vitro*, e *in vivo*

No LFDGV do CCA/UFSC, costuma-se realizar a conservação de germoplasma através dos materiais micropropagados em regime de multiplicação massal, tentando seguir o protocolo desenvolvido por Guerra et al. (1999). Recomenda-se, porém, separar a multiplicação massal dos brotos e a conservação de germoplasma, utilizando-se o protocolo desenvolvido por Guerra et al. (1999) para a multiplicação massal, e o meio de cultura com metade das concentrações do meio MS, citado por Soares (2003) para a conservação de germoplasma. O que, acredita-se, que aumentará o intervalo entre repicagens na conservação de germoplasma, economizando mão-de-obra e material.

Quanto ao banco de germoplasma "*in vivo*", será realizado na fazenda Experimental da Ressacada, com o objetivo de continuar a seleção feita pelo pesquisador Ademir Brancher, e de resguardar os genótipos também em forma de lavoura. Além disso, o banco "*in vivo*", ou "*on farm*" irá proporcionar programas de melhoramento a ser realizados por pesquisadores e estudantes da UFSC no futuro. As mudas a ser plantadas foram as que foram coletadas em Jaguaruna no dia 11 de setembro de 2008. Na tabela 5 constam quais genótipos e qual o número de representantes por genótipo.

Tabela 5. Número e classificação de mudas de abacaxizeiro coletadas no campo experimental de Jaguaruna da Estação Experimental da Epagri de Urussanga .

| <b>Acessos</b>    | <b>Plantas<br/>adultas</b> | <b>Rebentão</b> | <b>Filhote</b> | <b>Total</b> |  |
|-------------------|----------------------------|-----------------|----------------|--------------|--|
| Camboriú          | 0                          | 8               | 30             | 38           |  |
| CEJ               | 5                          | 0               | 0              | 5            |  |
| Jaguaruna         | 0                          | 5               | 40             | 45           |  |
| Delícia           | 0                          | 7               | 11             | 18           |  |
| Pérola NE         | 2                          | 0               | 0              | 2            |  |
| Urussanga         | 0                          | 7               | 7              | 14           |  |
| Armazém           | 0                          | 1               | 25             | 26           |  |
| Treviso B         | 0                          | 9               | 12             | 21           |  |
| AB 1 (Brancher 1) | 2                          | 0               | 0              | 2            |  |
| 7 NVZA            | 0                          | 5               | 10             | 15           |  |

#### **5.4.3. Outras atividades referentes a estudos com aclimação de mudas**

Além do tipo de substrato, estudou-se o desenvolvimento em diferentes tipos de recipientes de plantio, sendo bandejas de 128 e 72 células, calhões, tubetes, vasos e canteiro sob bancada (Figura 4 A a J). Estes estudos foram com o intuito de buscar a eficiência quanto aos custos com materiais, mão-de-obra, substrato, e produtividade (crescimento das mudas).

Em estudo com canteiro sob bancadas, a distância entre mudas foi uniforme, 8 centímetros entre plantas e entre linhas. O substrato a base de CAC, com 25% de CLO, diferiu na utilização e na quantidade do fertilizante top-mix. Houve 4 tratamentos, um com 0,8g de Top-mix por decímetro cúbico, um com 1,2 gramas de Top-mix por  $\text{dm}^3$ , outro com 1,7 gramas de Top-mix por  $\text{dm}^3$ , e outro sem a adição de Top-mix, porém não foi possível prosseguir com as avaliações devido a perdas de dados iniciais (dados arquivados em computador que teve seu HD inviabilizado).

Ainda sobre aclimação, realizou-se outras atividades que não podem ser organizadas como um experimento, mas servem de parâmetro para novos experimentos. Plantou-se mudas micropropagadas em tubetes (de raio de 3,5 cm, e coluna de substrato de 10 cm), em bandejas de 128 e de 72 células, em vasos pequenos e também em telhas ondulares de cimento-amianto.

#### **5.4.4 Atividades rotineiras de laboratório**

Além das atividades mencionadas foram executadas outras atividades rotineiras de laboratório, tais como: preparação de soluções estoques, de meios de cultura, esterilização de material, lavagem de material, trabalho em câmara de fluxo, repicagem de frascos em multiplicação de brotos, entre outros.

As atividades exercidas no Laboratório de Genética e Desenvolvimento Vegetal, LFDGV, foram dentre outras: preparação de soluções estoques, preparação de meio de cultura, esterilização de materiais e meios de cultura, utilização de autoclave industrial, utilização de estufa industrial, lavagem de material, eliminação e manuseio de material com produtos tóxicos, trabalho em câmara de fluxo, entre outros.

A preparação de solução estoque exige atenção e responsabilidade uma vez que experimentos e trabalhos de terceiros dependerão desta solução. A preparação desta consiste em seguir receitas já presentes no laboratório, utilizando substância

para análise, água destilada e autoclavada, e quando necessário um solvente que não seja a água.

A preparação de meio de cultura geralmente é individualizado no laboratório, ou seja, cada um faz o seu. Os meios de cultura que trabalhei enquanto estive trabalhando no laboratório foi o MS básico, e este suplementado com ANA (2  $\mu$ M) e BAP (4  $\mu$ M); ANA (2  $\mu$ M), BAP (4  $\mu$ M) e PBZ (6  $\mu$ M); PBZ (6  $\mu$ M); e PBZ (4  $\mu$ M).

A esterilização de materiais e meios de cultura foi geralmente realizada em autoclave industrial uma vez que esta permite a introdução de material na autoclave horizontalmente. A esterilização de materiais inertes se deu em 122°C durante 30 minutos, já a esterilização de meios de culturas utiliza a mesma temperatura, porém por 15 minutos. Utilizava-se ainda a autoclave para esterilizar materiais em crescimento contaminados por micro-organismos saprofíticos, com os mesmos procedimentos da esterilização de material inerte.

A lavagem de material é atividade quase que diária no laboratório em questão. É necessário que os frascos, pipetas, provetas, Beckers, etc, estejam sempre prontos para o uso. Por isso, é costume no laboratório cada um lavar o material que sujou. A lavagem é feita em duas etapas, a primeira lavagem é através de detergente com posterior tríplice lavagem, ou só tríplice lavagem (se for possível), a segunda lavagem faz-se através da tríplice lavagem apenas com água destilada e deionizada.

Nas atividades realizadas considera-se como produto tóxico apenas os fitorreguladores, PBZ, BAP, e ANA. Esses são todos hormônios vegetais sintéticos, e evitou-se a adição deste na natureza local, destinando-os a um galão presente na parte externa do laboratório, pertencente a empresa coletora de lixo que presta serviço para a universidade e que tem como dever realizar os procedimentos corretos para o tratamento de tais rejeitos.

O trabalho na câmara de fluxo requer cuidados para evitar contaminações nos materiais manuseados. Para isto, meios de culturas, discos de papel (sobre os quais se manuseia o material vegetal), placas de petri, e outros materiais que ainda podem ser utilizados como água destilada, são autoclavados. Lâminas (bisturis), pinças, fogareiros, ou seja, utensílios que não são autoclavados, mas que são necessários para o trabalho na câmara de fluxo passam por um período de 10 a 15 minutos de exposição à luz ultravioleta (aqueles materiais autoclavados também são expostos, exceto meios de cultura e água destilada). Após os procedimentos de assepsia, inicia-

se os trabalhos manuais vestidos com jaleco limpo, mãos lavadas, máscara no rosto, e borrifando álcool 70% sempre quando necessário nas mãos e braços.

No laboratório, foram ainda realizadas repicagens de culturas *in vitro* abacaxizeiro micropropagados em multiplicação (Figura 3 - letra g) Esses frascos deveriam ser repicados em intervalos de 35 dias, seguindo o protocolo desenvolvido por Guerra et al. (1999). Porém, não há bolsistas no laboratório trabalhando exclusivamente com a multiplicação desse material. Por isso, geralmente, o intervalo entre repicagens é maior que 40 dias. Isto torna mais onerosa e difícil a atividade, além, de facilitar a dominância apical, o que consequentemente diminui a taxa de multiplicação.



Figura 4. Aspectos da aclimação de mudas, oriundas de propagação “*in-vitro*”.  
A - Mudanças plantadas em canteiro sob bancada. B- Mudanças plantadas em calhão, (calhão 2). C- Mudanças desenvolvendo-se em tratamento em canteiro sob bancada. D- Mudanças desenvolvendo-se em calhão, (calhão 3). E - Mudanças plantadas em tubetes. F - Mudanças desenvolvendo-se em tubete. G – Mudanças plantadas em telha ondulada. H - Mudanças desenvolvendo-se em telha ondulada. I – Mudanças desenvolvendo-se em bandeja de 120 células. J – Mudanças desenvolvendo-se em vasos.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O que me motivou a realizar o estágio de conclusão de curso em Resgate e multiplicação de material crioulo de abacaxizeiro em Santa Catarina, foi saber que há um projeto em andamento que poderá se beneficiar das atividades desenvolvidas neste período. O projeto prevê que a UFSC será a distribuidora e multiplicadora de mudas de abacaxizeiro. Com o resgate de material crioulo selecionado na estação experimental da EPAGRI em Jaguaruna, a UFSC terá possibilidade de oferecer aos produtores mudas com potencial produtivo comprovado por anos de seleção. Além disso, a implantação de bancos de germoplasma “*in vitro*”, inclusive com variedades potencialmente produtivas, permitirá o intercâmbio de material com outras instituições, podendo adicionar ao banco do LFDGV novos genótipos, até mesmo resistentes à fusariose. O banco de germoplasma ex situ possibilitará a execução de trabalhos futuros de melhoramento genético, a partir de genótipos potencialmente produtivos e cultiváveis. Os estudos de aclimatização, mesmo estando no início, poderão ajudar os responsáveis por essa etapa a escolher a melhor forma para proporcionar ambiente ótimo para desenvolver as mudas e prepara-las para o transplante definitivo.



## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CABRAL, J. R. S.; MATOS A. P. de; SOUTO G. F. Reação de germoplasma de abacaxi à inoculação com *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. IN: Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.20, n.7, p. 787-791, 1985.

Cabral 2004 – Abacaxi ganha espaço no Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www23.sede.embrapa.br:8080/aplic/bn.nsf/f7c8b9aeabc42c8583256800005cfec7/28bb47623641c64383256ec9005ec03c?OpenDocument>>. Acessado em 30 de setembro 2008.

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V.D.; COSTA, M. A. C.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CABRAL, J. R. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. IN: Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 39, n.7, p. 717- 720, jul. 2004.

COUTO, F. A. A.; RAMOS V. H. V; TANAKA M. A. S. Comparação entre métodos para identificar mudas de abacaxizeiros portadoras de fusariose. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7, 1983, Florianópolis. Anais... Florianópolis: Sociedade Brasileira de Fruticultura/EMPASC, 1984.

DAQUINTA M.; BENEÇA R. Breve revision Del cultivo de tejidos em piña. Centro de bioplasmas. Instituto Superior Agrícola de Ciego de Ávila cp.: 69450 Cuba. Pineapple news v.3, n.1, p. 7-9, 1997.

DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; BELÓ, A.; FEUSER, S.; OLIVEIRA, E. N.; BRANCHER, A.; ZAFFARI, G. R.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Qualidade genotípica de mudas e performance a campo de plantas micropropagadas de abacaxizeiro. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.22, n.1, p.80-85, 2000.

Embrapa mandioca e fruticultura – Cultivo do abacaxi em Rondônia. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Abacaxi/CultivodoAbacaxiRO/espacamento.htm>> Acessado em 9 de setembro de 2008.



FEUSER, S. Micropropagação de abacaxizeiro (*Ananas comosus*) e avaliação da fidelidade genotípica por marcadores moleculares. Dissertação (Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis, SC. 70p, 2000.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER A. R.; NODARI R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 34: 1557-1563, 1999.

ICEPA – Desempenho de produção vegetal: Fumo. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br/>>. Acessado em 13 de novembro 2008

MAEDA, A. S. Adubação foliar e na produtividade e na qualidade. Dissertação ILHA SOLTEIRA – SP, 2005.

MARIN, J.O.B.; DE CARVALHO, S. P.; PRADO, L. D. A.; PEREIRA, J. M. Panorama geral da produção de abacaxi e comportamento sazonal dos preços do abacaxi “Pérola” comercializado em Goiás In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008, Rio Branco. Amazônia, mudanças globais e agronegócio - o desenvolvimento em questão. Brasília : Sober, 2008..

MELO, A. S. DE; AGUIAR NETTO, A. O.; DANTAS NETO, J.; BRITO, M. E. B.; VIEGAS, P. R. A.; MAGALHAES, L. T. S.; FERNANDES, P.D. Desenvolvimento vegetativo, rendimento da fruta e otimizacao do abacaxizeiro cv. Perola em diferentes níveis de irrigação. Ciência Rural v.36, n.1, p 93-98, 2006

PASQUAL, M.; MOREIRA, M. A.; ANJOS SOBRINHO, A. dos. Biotecnologia aplicada à produção de mudas de abacaxi. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 19, n. 195, p. 20-23, 1998.

PIMENTEL, C. Metabolismo de carbono na agricultura tropical. Seropédica: Edur, 159 p. 1998.

RECH FILHO, A. Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias. Dissertação. (Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis, SC. 73p, 2004.

REINHARDT, D. H. R. C. Manejo e produção de mudas de abacaxi. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 19, n. 195, p. 13-19, 1998.

SANTOS, B. A. ; ZAMBOLIM, L. . Severidade de isolados de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* sensíveis e resistentes ao benomyl em abacaxizeiro. Fitopatologia Brasileira, Fortaleza, v. 27, n. 1, p. 101-103, 2002.

SOARES, A. R, Estabelecimento de condições de crescimento mínimo de plantas de abacaxi visando conservação in vitro de germoplasma. Relatório de estágio de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Santa Catarina), Florianópolis – SC, 13p. 2003.

SOUTO, G. F.; CUNHA G. <sup>a</sup> P. da; CABRAL J.R.S. Avaliação de resistência a *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* em abacaxi. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 7, 1983, Florianópolis. Anais... Florianópolis: Sociedade Brasileira de Fruticultura/EMPASC, 1984.

SOUZA JUNIOR, E. E.; BARBOZA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeito de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L) Merrill) CV. Pérola. Pesquisa agropecuária Tropical, 31(2): 147-151, 2001.

SRIPAORAYA, S.; MARCHANT, R.; POWER, B.; DAVEY, M. R. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* (L.)) In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant 39:450–454, September–October 2003

TAIZ, L; ZEIGER, E. Plant physiology. Second edition. Ed. Sinauer. 1998

TEIXEIRA, J.; CRUZ, A. R. R.; FERREIRA, F. R. CABRAL, J. R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. Biotecnologia ciência e Desenvolvimento, Brasília, v.3,p.42-47, 2001.